

2/9/1 (Item 1 from file: 351)
DIALOG(R)File 351:DERWENT WPI
(c)1996 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

004591154 WPI Acc No: 86-094498/15
XRAM Acc No: C86-040303

Monoclonal antibodies to macrophage migration inhibitory factor useful
for cytokinin analysis and diagnosis of immune diseases

Index Terms: MONO CLONE ANTIBODY MIGRATION INHIBIT FACTOR MACRO PHAGE;
USEFUL ANALYSE DIAGNOSE IMMUNE DISEASE CYTOKININ

Patent Assignee: (DEAK) AKAD WISSENSCHAFT DDR

Author (Inventor): SCHUMANN I; FAHLBUSCH B; DORNBERGER G

Number of Patents: 001

Patent Family:

CC Number	Kind	Date	Week
DD 230876	A	851211	8615 (Basic)

Priority Data (CC No Date): DD 250741 (830509)

Abstract (Basic): DD 230876

Antibodies to human macrophage migration inhibitory factor (MIF) are produced by isolating MIF from tumour-induced ascites, purifying the MIF by alpha-L-fucose-Sepharose 4B affinity chromatography, using the carrier-bound MIF to immunise 6-12 week old female Balb/c or AB/Jena mice, fusing the hyperimmune mouse spleen cells in 10:1 ratio with P3-X63-Ag8.653 myeloma cells, selecting stable hybridoma cell lines with a MIF antibody prodn. of more than 200 ng by multiple single cell cloning, and opt. isolating the antibodies by pptn. from culture supernatants or from the ascitic fluid of hybridoma-bearing mice.

USE/ADVANTAGE - The antibodies are useful for cytokin analysis (detection and isolation of MIF from biological fluids and sepn. of MIF from other cytokins) and for diagnosis of immune diseases. They react specifically with MIF, without cross reaction with other cytokins, and can be produced in unlimited amts. and with uniform quality. @ (6pp

Dwg.No.0/4)@

File Segment: CPI

Derwent Class: B04; D16;

Int Pat Class: A61K-039/39; C12N-005/02



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 230 876 A1

4(51) C 12 N 5/02
A 61 K 39/395

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 N / 250 741 2	(22)	09.05.83	(44)	11.12.85
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, Rudower Chaussee 5, DD
(72)	Schumann, Ingrid, Dr. rer. nat.; Fahlbusch, Bärbel, Dr. rer. nat.; Dornberger, Gesche, DD

(54) Verfahren zur Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen Human-MIF

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Gewinnung eines monoklonalen Antikörpers mit spezifischer anti-Human-MIF-Aktivität. Die Erfindung ist zur Anwendung in der biologischen und humanmedizinischen Grundlagenforschung, zur Diagnose von Immunkrankheiten und zur Anwendung in der Immunpräparate herstellenden pharmazeutischen Industrie geeignet. Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung monoklonaler Antikörper gegen das Human-Cytokin MIF. Die Aufgabe, ein hinreichend einfaches und zuverlässig handhabbares Verfahren zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gegen Human-MIF, anzugeben, wurde gelöst, indem zunächst Human-MIF aus Ovarialcarcinom isoliert und an α -L-Fucose-Sephrose 4B gekuppelt wurde. Das trägerfixierte MIF-Material diente zur Immunisierung von Mäusen, deren immune Milzzellen mit Myelomzellen der Linie P3-X63-Ag8.653 nach der bekannten Hybridomtechnik fusioniert wurden. Von den erhaltenen Hybridomen wurden nach Ermittlung der spezifischen Antikörperproduktion schließlich stabile monoklonale Hybridzelllinien selektioniert.

ISSN 0433-6461

6 Seiten

BEST AVAILABLE COPY

08/243342

7815-008

REF. CG

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen Human-MIF mit Hilfe der Hybridomtechnik, **gekennzeichnet** dadurch, daß Cytokin MIF, gewonnen aus tumorbedingtem Human-Aszites, durch an sich bekannte α -L-Fukose-Sephrose 4B-Affinitätschromatografie angereichert wird, so gewonnenes Träger- gebundenes MIF-Material zur Immunisierung von 6 bis 12 Wochen alten weiblichen Balb/c- oder AB/Jena-Mäusen eingesetzt wird, die hyperimmunen Milzzellen im Verhältnis 10:1 mit Myelomzellen der Linie P3-X63-Ag8.653 fusioniert werden, aus den erhaltenen Hybridomen mittels anschließender mehrfacher Einzelzell-Klonierungen stabile monoklonale Hybridzelllinien mit einer MIF-Antikörper-Produktion > 200 ng/ml selektioniert werden und der gebildete Antikörper gegebenenfalls entweder aus den Kulturüberständen oder aus der Aszitesflüssigkeit Hybridom-tragender Mäuse durch Fällung nach üblichen Methoden gewonnen wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet** dadurch, daß 8 Wochen alt AB/Jena-Mäuse immunisiert werden, 10^6 immune Milzzellen mit 10^7 Myelomzellen fusioniert werden, zur Erzeugung des MIF-Antikörpers in vivo thymuslose weibliche AB/Jena-Mäuse (nu/nu) eingesetzt werden und die Fällung des Antikörpers mit Ammoniumsulfat (50%) durchgeführt wird.

Hierzu 2 Seiten Abbildungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erzeugung von monoklonalen Antikörpern gegen Human-MIF ist von beträchtlicher Bedeutung sowohl für die Cytokin-Analytik als auch für die Diagnose von Immunkrankheiten des Menschen. Das Anwendungsgebiet der Erfindung liegt also in der humanmedizinischen Forschung und nachgelagert in der Immuntherapie sowie in der Immunpräparate herstellenden pharmazeutischen Industrie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Der Makrophagen-wanderungshemmende Faktor (MIF-Macrophage migration inhibitory factor) beeinflusst die Wanderung von Makrophagen. Er spielt in der zellulären Immunantwort des tierischen und menschlichen Organismus eine Rolle, z. B. wurde er bei Tumorabwehrreaktionen des Wirts, bei Autoimmunerkrankungen und bei allergischen Reaktionen vom verzögerten Typ nachgewiesen.

Der Makrophagen-wanderungshemmende Faktor konnte z. B. in Kulturüberständen sensibilisierter Lymphozyten (David, J. R., Proc. natn. Acad. Sci. USA, 56, 72, 1966; Preece, A. W.: Clin. exp. Immun. 18, 543, 1974; W. Zschiesche et al.: Agents and Actions 8, 515, 1978), im Mäuseserum nach Tiloroninduktion (Mayer, G. D. et al.: Science 169, 1215, 1970; W. Zschiesche et al.: Agents and Actions 8, 515, 1978) und im Aszites tumortragender Ratten bestimmt werden (Fahlbusch, B. et al.: Acta biol. med. germ. 40, 785, 1981; W. Zschiesche et al.: Acta virol. 24, 37, 1980).

Bei allen oben genannten immunologischen Abwehrreaktionen werden neben dem MIF noch weitere Cytokine gebildet, die ebenfalls auf Makrophagen einwirken. Mit herkömmlichen biochemischen Methoden konnte eine Trennung der Faktoren voneinander jedoch nicht erreicht werden. Bekannt sind Versuche, mit Hilfe von polyvalenten Anti-Lymphokinantikörpern über eine Antikörperbindungsreaktion in vitro eine Trennung der einzelnen Faktoren durchzuführen.

So wurden von Onazaki, K. et al. (Cell. Immun. 55, 465, 1980) Antikörper gegen Meerschweinchen-MIF und von Block, L. H. et al. (J. exp. Med. 147, 541, 1978) und von Brandt, E. (Patent EP 0020090) gegen Human-MIF gewonnen.

Auf diese Weise wurden polyvalente Antikörper gegen MIF erhalten. Diese sind mit dem Nachteil behaftet, daß sie zusätzlich zur Reaktion mit MIF auch mit anderen Faktoren kreuzreagieren.

Bekannt ist weiterhin die sogenannte Hybridomtechnik (Köhler, G. et al.: Nature, 256, 495, 1975; Eur. J. Immunol. 6, 511, 1976; Milstein, C. et al.: Nature 266, 550, 1977), mit der es erstmals möglich war, monoklonale Antikörper gegen zelluläre und Proteinantigene (Luben, R. A. et al., J. Clin. Invest. 64, 337, 1979), so z. B. gegen den osteoklastaktivierenden Faktor, der wie MIF ein schwaches Antigen ist, herzustellen, d. h. Antikörper, die nur gegen eine Antigen determinante gerichtet sind. Hingegen ist die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen MIF über die Bildung von Hybridomen bisher nicht bekannt.

Bekannt ist außerdem, daß MIF am Makrophagen über einen fukosehaltigen Rezeptor gebunden wird. (Remold, H. H.: J. exp. Med. 138, 1065, 1973). Schließlich ist auch beschrieben, daß das Cytokin MIF über eine α -L-Fucose-Sephrose-Säule affinitätschromatografisch angereichert werden kann.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung bezweckt, monoklonale Antikörper gegen das Human-Cytokin MIF bereitzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein hinreichend einfaches und zuverlässig handhabbares Verfahren zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern, die gegen das Human-Cytokin MIF wirksam sind, anzugeben.

Erfindungsgemäß wurde diese Aufgabe gelöst, indem zunächst aus tumorbedingtem Human-Aszites, vorzugsweise aus Human-Ovarialkarzinom-Aszites, ein Makrophagen-wanderungshemmender Faktor (MIF) durch α -L-Fucose-Sephrose 4B affinitätschromatografisch angereichert wird, wobei zum Nachweis der MIF-Aktivität der Agarose Tropfen-Test nach B. Fahlbusch et al. (Acta biol. med. germ. 38 (1979), eingesetzt wird.

Zur anschließenden Immunisierung von weiblichen Balb/c- oder AB/Jena-Mäusen (6 bis 12 Wochen, vorzugsweise 8 Wochen, alt) wird direkt die MIF-gekuppelte Sepharose verwendet. Die Antigen-Applikation wird über mehrfache intraperitoneale Verabreichung von 0,2 ml MIF-Fucose-Sephrose-Suspension in PBS durchgeführt. 3 bis 5 Tage nach der letzten Verabreichung wird aus den hyperimmunen Milzen der Mäuse eine Zellsuspension hergestellt. In der Proportion 10:1 werden immune Milzzellen und Myelomzellen (P3-X63-Ag8.653), die als Zelllinie zur Verfügung standen, — vorzugsweise 10^6 immune Milzzellen und 10^7 Myelomzellen — zusammen in proteinfreiem Medium, vorzugsweise in Medium RPMI 1640 oder DMEM, gewaschen, und das Zell-Sediment wird zur Zellfusionierung verwendet.

Die Fusion wird nach der an sich bekannten Hybridomtechnik in der Modifikation von Galfre durchgeführt. Auf diese Weise entstehen unter anderem Verschmelzungsprodukte aus den antikörperproduzierenden Milzzellen und den Myelomzellen, Hybridome genannt, die die Antikörper-Synthese permanent beibehalten.

Die Hybridom-Zellüberstände werden 3 bis 5 Wochen nach der Fusion auf Antikörperproduktion getestet, und zwar durch einen unspezifischen RIA und einen anschließenden Antigen-spezifischen RIA.

Von durch diese Tests ausgewählten Hybridomen mit hinreichend starker MIF-Antikörperproduktion werden durch mehrfache Einzelzell-Klonierungen sodann stabile monoklonale Hybridzelllinien selektioniert.

Auf diese Weise ist insbesondere die stabile, mehrfach klonierte Hybridomlinie 29/24 B 11 erhalten worden, die den erfindungsgemäßen neuen Antikörper, den monoklonalen MIF-Antikörper, permanent in einer Menge > 200 ng/ml in der Zellkultur synthetisiert.

Die weitere Aufarbeitung des neuen MIF-Antikörpers erfolgt auf an sich bekannter Weise entweder aus den Kulturüberständen der stabilen monoklonalen Hybridzelllinien oder aus der Aszitesflüssigkeit von Mäusen, denen Hybridome der mehrfach klonierten monoklonalen Zelllinien, vorzugsweise der Hybridomlinie 29/24 B 11, inokuliert worden sind, durch Fällung, vorzugsweise durch Fällung mit 50%igem Ammoniumsulfat.

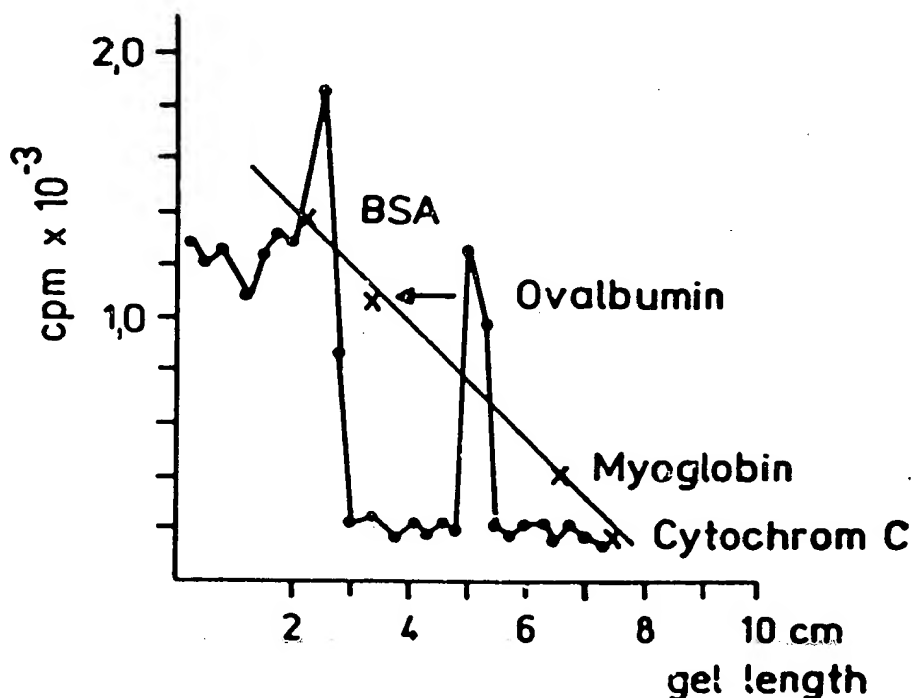
Erfolgt die Aufarbeitung aus dem Aszites von Hybridom-tragenden Mäusen, so sind hier weibliche thymuslose AB/Jena-Mäuse (nu/nu) dann einzusetzen, wenn für die voranstehende Milzzellpräparation weibliche AB/Jena-Mäuse herangezogen worden sind.

Ergänzend zu den genannten Radioimmuntests ist der erhaltene monoklonale Antikörper mit Hilfe eines Affinitätschromatografischen Verfahrens auf seine anti-MIF-Aktivität prüfbar, indem der Antikörper an BrCN-Sephrose 4B gekuppelt und anschließend das Antigen MIF über die Säule geschickt wird. Der Antikörper bindet das MIF-Antigen. Durch Zugabe von 0,1 M Essigsäure ist das Antigen wieder ablösbar und seine biologische Aktivität im Migrationshemmtest (Agaroselektrophorese) nachweisbar.

(Siehe Anlage).

Der verfahrensgemäß hergestellte monoklonale Antikörper gegen Anlage zu Seite 4 der Erfindungsbeschreibung. Es wurde weiterhin der Nachweis geführt, daß der anti-MIF-Effekt der Hybridomlinie 29/24B11 tatsächlich auf ein synthetisiertes Immunglobulin zurückzuführen ist. Dazu wurde die Hybridomlinie 29/24B11 für 24 Stunden in Gegenwart von 5 bis 10 μ Ci/ml L-¹⁴C-Leucin (spezifische Aktivität 240 mCi/mM) in serumfreiem Medium (ohne Leucin) inkubiert. Der daraus resultierende Hybridomüberstand wurde mittels Polyacrylamid-SDS-Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen untersucht. Es waren 2 radioaktive Peaks nachweisbar. Der erste mit einem Molekulargewicht von 28000 entspricht der leichten Kette und der zweite mit einem Molekulargewicht von 60000 entspricht der schweren Kette eines biosynthetisch markierten γ -Globulins (vergleiche Abbildung 3).

Abb. 3



Human-MIF ist einsetzbar sowohl als Reagenz in der Cytokin-Analytik (Nachweis und Gewinnung von MIF aus biologischen Flüssigkeiten, Abtrennung des MIF von anderen Cytokinen) als auch als Diagnostikum von Immunkrankheiten des Menschen. Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung besitzt die Vorteile,

- monoklonale Antikörper gegen das schwache Antigen Human-MIF bereitzustellen,
- einen monoklonalen Antikörper zu liefern, der spezifisch nur mit MIF reagiert (keine Kreuzreaktion mit anderen Cytokinen),
- einen MIF-Antikörper in unbegrenzter Menge und einheitlicher Qualität zur Verfügung zu stellen.

Ausführungsbeispiel

1. Antigenpräparation

Ein Makrophagen-wanderungshemmender Faktor wurde aus dem Aszites einer Ovarialcarzinompatientin (Stadium IV der Krankheit, unbehandelt); in folgender Weise angereichert: 1 ml zellfreier Aszites (= OC5) wird auf eine α -L-Fucose-Sepharose 4B-Säule (10 cm \times 0,5 cm) aufgetragen.

Das erste Eluat (nichtgebundener Anteil) weist keine MIF-Aktivität mehr auf. (Abb. 1)

Diese kann nach Eluierung mit 0,5 M α -L-Fucose wieder von der Säule abgelöst werden.

Die MIF-Aktivität wurde mit dem Agarosetropfentest nach Fahlbusch, B. et. al. (Acta. biol. med. germ. 38, 1453, 1979) nachgewiesen.

Um die Antigenität des Faktors zu erhöhen, wurde unmittelbar die MIF-gebundene Sepharose zur intraperitonealen Applikation von Mäusen verwendet.

2. Immunisierung und Zellfusion

a) Milzzellpräparation für die Fusionierung

8 Wochen alte weibliche AB/Jena-Mäuse (institutseigene SPF-Zucht) erhielten an den Tagen 0, 7, 14, 21 und 63 je 0,2 ml Suspension von MIF-Fucose-Sepharose (Δ 500 E MIF, d. h. bis zu einer Verdünnung von 1:500 ist eine signifikante Wanderungshemmung noch nachweisbar) in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) intraperitoneal. 4 Tage nach der letzten Injektion wurden die Milzen entnommen und eine Milzzellsuspension hergestellt. Die Milzzellen wurden in proteinfreiem Medium (RPMI 1640 mit 20 mM HEPES-Puffer, pH 7,2) gewaschen.

b) Bereitstellung von Myelomzellen für die Fusionierung

Für die Fusionierung wurde die permanent in vitro wachsende Balb/c P3-X63-Ag8.653 Myelomzelllinie, die von der MOPC-21 Linie abstammt und an Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT E.2.2.4.2.8) defizient ist, eingesetzt.

Die Myelomzelllinie ist ferner dadurch charakterisiert, daß sie keine eigene Immunglobulinsynthese mehr besitzt und ihr Wachstum durch Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Selektivmedium (HAT-Medium) gehemmt wird. Die Zellen werden in RPMI 1640 Kulturmedium, das 10% foetales Kälberserum (FKS) enthält, kultiviert.

Vor der Zellfusion wurden die Myelomzellen einmal in serumfreiem Medium gewaschen.

c) Zellfusionierung

10^8 Milzzellen wurden mit 10^7 Myelomzellen in Gegenwart von 50% Polyäthylenglykol (PEG) 1550 fusioniert, wie von Galfre, G. et. al., Nature 266, 550, 1977, beschrieben.

Durch HAT-Selektion nach Littlefield, J. W., Science 145, 709, 1964, wurden Hybridome gewonnen, deren Zellkulturüberstände 3 bis 5 Wochen nach der Zellfusion auf Antikörperproduktion getestet wurden.

d) Nachweismethoden der Antikörperproduktion

Mit einem unspezifischen Radioimmunttest (RIA) wurde die Immunglobulinsynthese erfaßt, und die Klone mit einer Syntheseleistung von mehr als 20 ng/ml wurden auf anti-MIF-Antikörperproduktion geprüft.

Dazu dienten folgende Tests:

a) spezifische RIA

MIF-beschichtete PVC-Folien wurden mit Hybridomüberständen inkubiert. Das gebundene Mäuse-gammaglobulin (antigenspezifisch) wurde mit Hilfe von 125 J-markiertem anti-Mäuse-gammaglobulin nachgewiesen.

b) spezifischer Nachweis von anti-MIF-Aktivität im biologischen Test

Zur Anreicherung von Gammaglobulin aus Hybridomüberständen wurden diese an anti-Mäuse-gammaglobulin beschichtete Folien gekuppelt. Danach wurde angereichertes MIF-Material zugegeben.

Bei Anwesenheit eines anti-MIF-Antikörpers wird die MIF-Aktivität völlig oder teilweise neutralisiert, wie im Agarosetropfentest nachgewiesen wurde. Bei negativen Proben behält die MIF-Probe ihre volle Aktivität. Auf diese Weise wurden anti-MIF-produzierende Klone mit einer Syntheseleistung von mehr als 200 ng/ml selektioniert.

Nach dieser Ermittlung von anti-MIF-synthetisierenden Hybridomen wurden durch mehrfache Subklonierungen monoklonale Klonlinien erhalten.

Aus dem so durchgeführten Fusionsexperiment wurden einige anti-MIF-produzierende Hybridzelllinien, darunter Klon 29/24B11 und Abkömmlinge, erhalten.

Die stabile, mehrfach klonierte Hybridomlinie 29/24B11 synthetisiert den Antikörper permanent in der Zellkultur. Sie vermehrt sich auch in nackten thymuslosen (nu/nu) Mäusen. Der Antikörper konnte nach 3 bis 5 Wochen aus dem Serum oder der Aszitesflüssigkeit gewonnen werden.

Der monoklonale Antikörper wurde zusätzlich auf folgende Weise auf seine anti-MIF-Aktivität geprüft:

Der aus Kulturflüssigkeit, Aszites bzw. Serum tumortragender Mäuse isolierte monoklonale Antikörper sowie entsprechende Kontrollen (Kulturüberstand der Myelomzelllinie bzw. Kontrollaszites tumorfreier Mäuse) wurden an BrCN-Sepharose 4B gekuppelt.

Die gekuppelten Gele wurden in kleine Säulen (10 cm \times 0,5 cm) gefüllt und mit PBS bzw. Glycin/HCl-Puffer, pH 2,8, im Wechsel gewaschen. Anschließend wurden je 1 ml zellfreier Aszites einer Ovarialcarcinompatientin (OC5) auf die Säule aufgetragen und mit PBS, pH 7,2, solange gewaschen bis die Extinktion bei 280 nm null beträgt. Das erste Eluat (nichtgebundener Anteil) wird in Verdünnungen von 1:20, 1:40 und 1:80 im MIF-Agarosetropfentest eingesetzt.

Das gebundene Antigen (MIF) wird mit 0,1 M Essigsäure durch Spülen der Säule abgelöst (2. Eluat). Dieses Eluat wurde gegen PBS dialysiert und bei einer Verdünnung von 1:40 ebenfalls im biologischen MIF-Test untersucht. (Abb. 2).

Legende zu den Abbildungen 1 und 2

Abb. 1 Affinitätschromatografie von 1 ml Ovarialtumoraszites an α -L-Fucose-Sepharose 6B Waschen der Säule mit PBS, pH 7,4 (Fraktion I und II) und Elution mit 0,5 M α -L-Fucose in PBS, pH 7,4 (Fraktion III).

a) 1:10 b) 1:50 c) 1:100 d) 1:200 e) 1:400 f) 1:800

Abb. 2 Nachweis der Bindung von MIF durch einen monoklonalen Antikörper aus Aszites (A) oder durch Immunglobulin aus Kontrollaszites (B), die an BrCN-Sepharose 4B gekuppelt wurden.

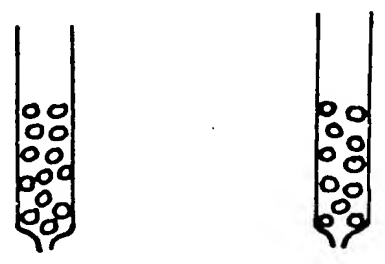
C = Wanderungshemmwert des aufgetragenen MIF-Materials.

A B
Ascites Kontrollascites

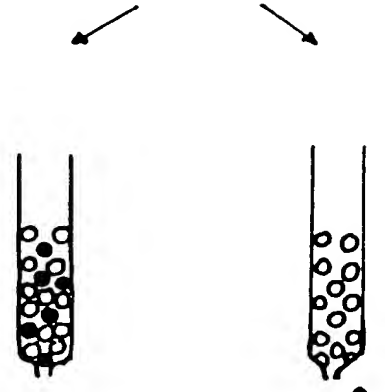
A B C

MIF-Test

gekuppelt an Sepharose 4B

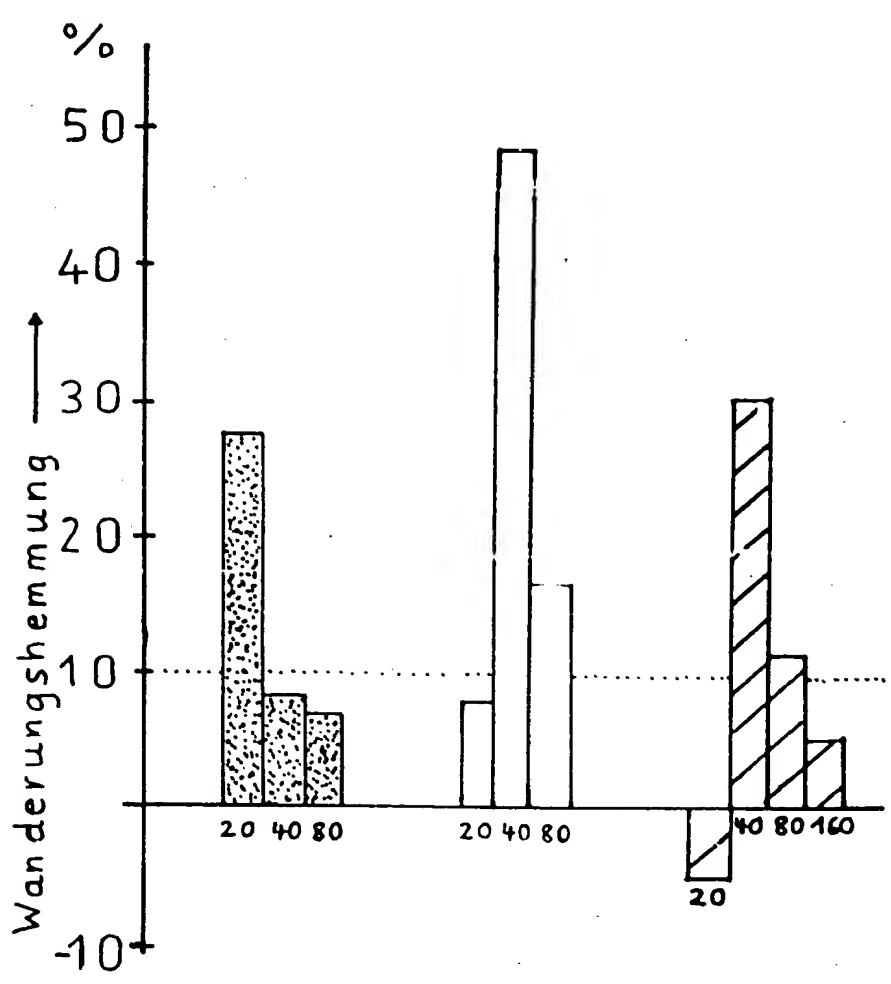


+ MIF

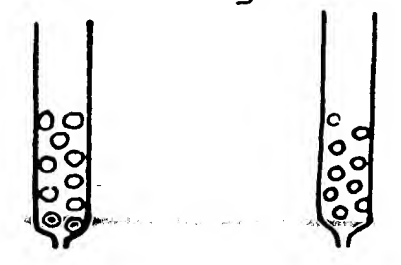


MIF-Test

Ergebnis

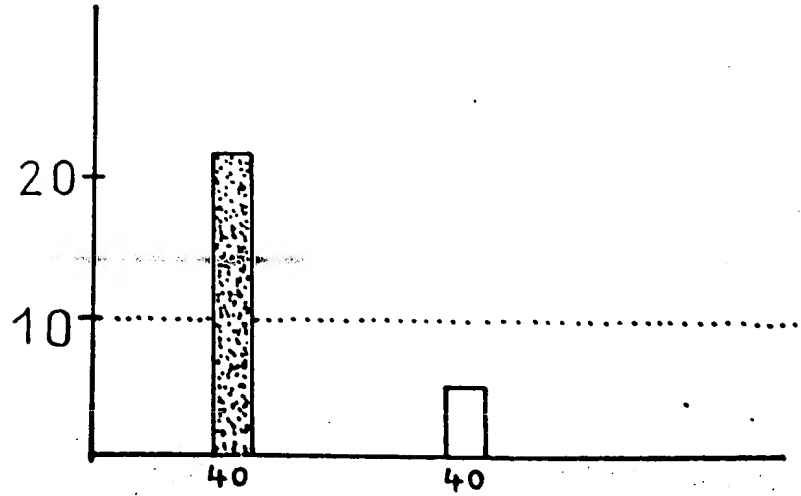


+ 0,1M Essigsäure



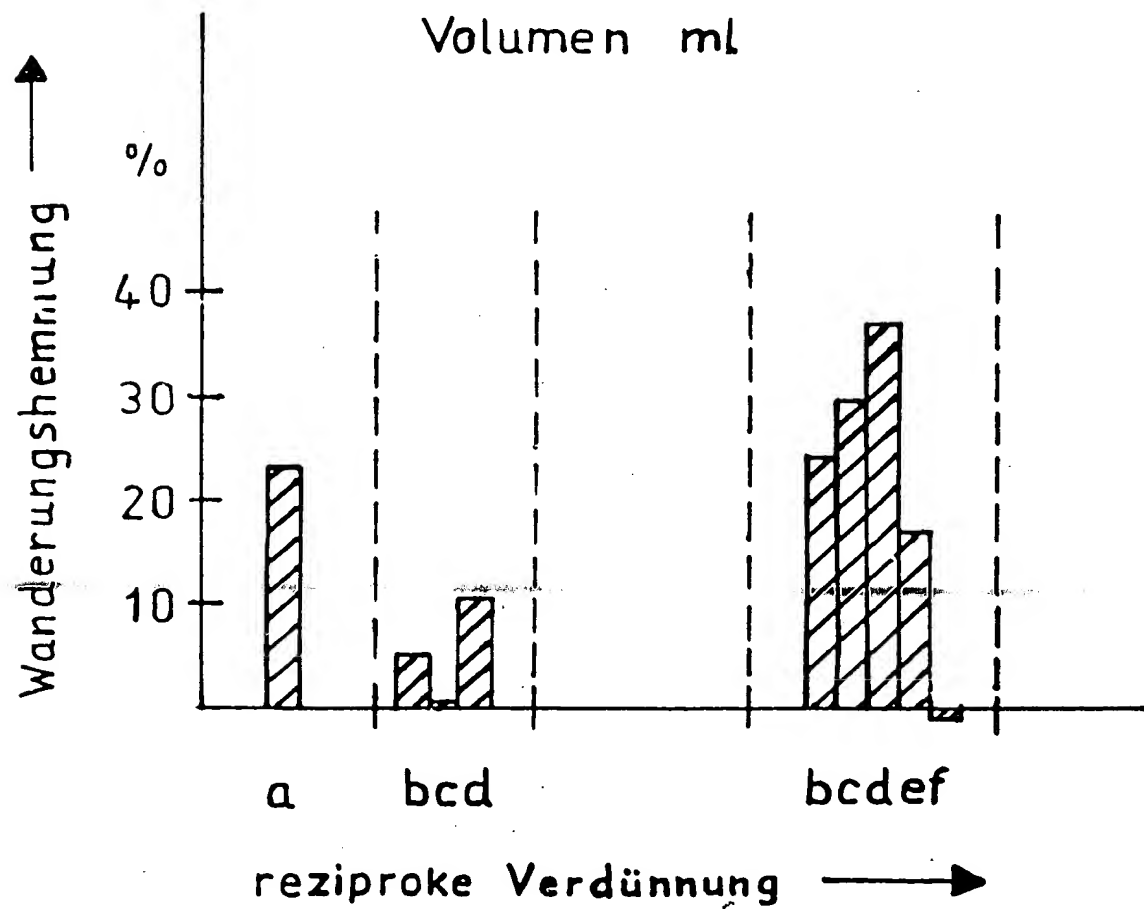
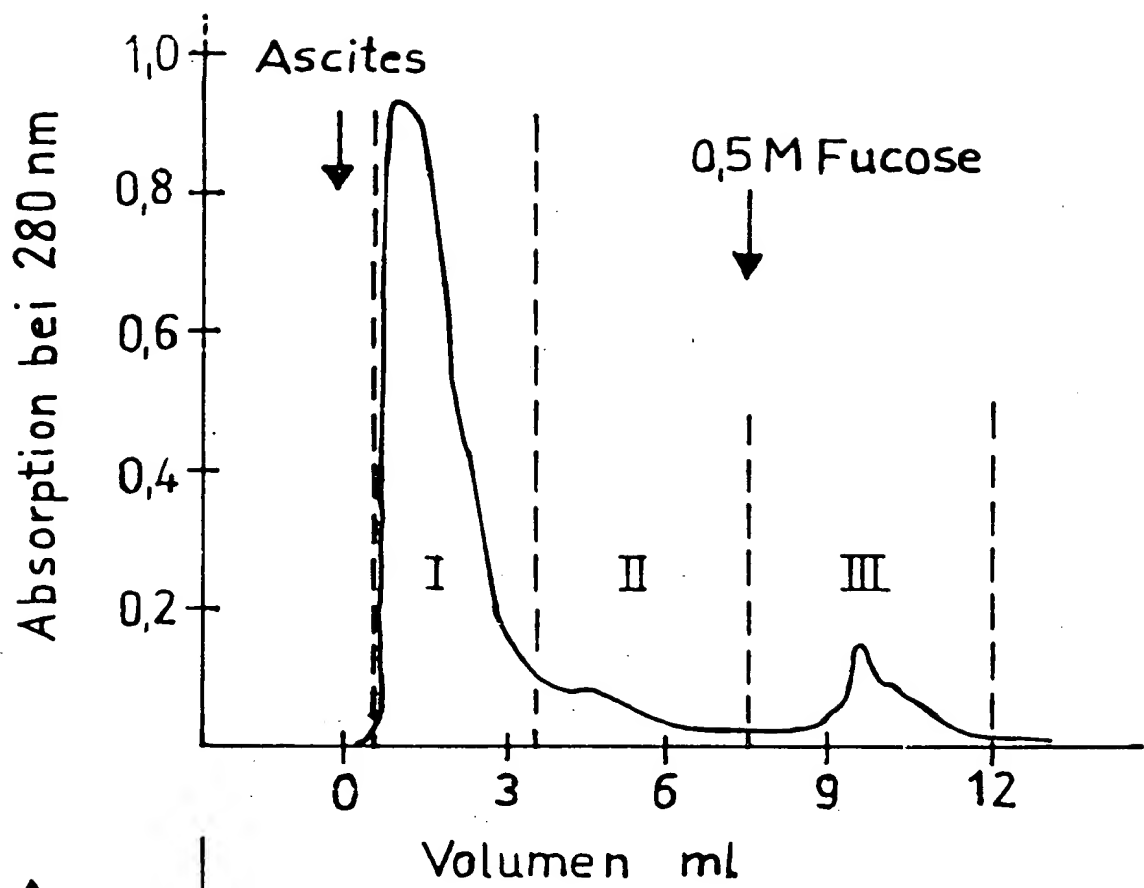
MIF-Test

Ergebnis



reziproke Verdünnung

10 JUN 1983 095050



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.